

PATENT COOPERATION TREATY

21 MAY 2002
PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF COPIES OF TRANSLATION OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SATO, Kazuo
Kyowa Patent & Law Office
Room 323, Fuji Bldg.
2-3, Marunouchi 3-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0005
JAPON

| | |
|--|---|
| Date of mailing (day/month/year) 20 February 2002 (20.02.02) | |
| Applicant's or agent's file reference 127109-648 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP00/06104 | International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00) |
| Applicant MEIJI SEIKA KAISHA, LTD. et al | |

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AT,CA,CH,CN,FI,KP,NO,NZ,RO,RU,SK,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

AP,EA,AE,AG,AL,AM,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EE,ES,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,PL,PT,SD,SE,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW,OA

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer Eliott PERETTI |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

2002 (PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|--|
| Applicant's or agent's file reference 127109-648 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP00/06104 | International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00) | Priority date (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/80, 1/15, C12P 21/00 // (C12N 15/80, C12R 1:645) (C12N 1/15, C12R 1:645) (C12P 21/00, C12R 1:645) | | |
| Applicant MEIJI SEIKA KAISHA, LTD. | | |

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|--|--|
| Date of submission of the demand 09 April 2001 (09.04.01) | Date of completion of this report 09 July 2001 (09.07.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:***

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-18 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-18 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-18 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1: EP, 382173, A2 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.) 16 August 1990

Document 2: JP, 7-123987, A (Amano Pharmaceutical Co., Ltd.) 16 May 1995

The inventions set forth in Claims 1-18 appear to involve an inventive step with respect to documents 1 and 2 cited in the international search report. Documents 1 and 2 do not describe stable regulatory sequences functioning in filamentous fungi, in particular, *Mycelia sterilia*, an expression system, and production process for target proteins in *Mycelia sterilia* utilizing these. Furthermore, persons skilled in the art cannot easily conceive of these matters from the descriptions in documents 1 and 2.

REC'D 20 JUL 2001

WIPO PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

| | | |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 127109-648 | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JPO0/06104 | 国際出願日 (日.月.年) 07.09.00 | 優先日 (日.月.年) 07.09.99 |
| 国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00 /(C12N15, 80, C12R1:645) (C12N1/15, C12R1:645) (C12P21/00, C12R1:645) | | |
| 出願人(氏名又は名称) 明治製菓株式会社 | | |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 09.04.01 | 国際予備審査報告を作成した日 09.07.01 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 本間 夏子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4N 9637 |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|----------------|-------|------|---|
| 新規性 (N) | 請求の範囲 | 1-18 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |
| 進歩性 (IS) | 請求の範囲 | 1-18 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-18 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1: EP 382173 A2 (明治製菓株式会社) 16. 8月. 1990
文献2: JP 7-123987 A (天野製菓株式会社) 16. 5月. 1995

請求の範囲1-18に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献1-2に対して進歩性を有する。文献1-2には糸状菌、特にMycelia steriliaで安定して機能する制御配列および発現ベクター系、さらにそれを利用したMycelia steriliaにおける目的タンパク質の製造法が記載されておらず、しかもその点は文献1-2から当業者といえども容易に想到し得ないものである。

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 15 日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/18219 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/80, 1/15, C12P 21/00
// (C12N 15/80, C12R 1:645) (C12N 1/15, C12R 1:645)
(C12P 21/00, C12R 1:645)

(74) 代理人: 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.); 〒100-0005
東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号
協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06104

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 7 日 (07.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/252851 1999 年 9 月 7 日 (07.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製
菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒
104-8002 東京都中央区京橋二丁目4番16号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺 学
(WATANABE, Manabu) [JP/JP]. 村上 健 (MU-
RAKAMI, Takeshi) [JP/JP]; 〒250-0852 神奈川県小田
原市栢山788 明治製菓株式会社 薬品技術研究所内
Kanagawa (JP).

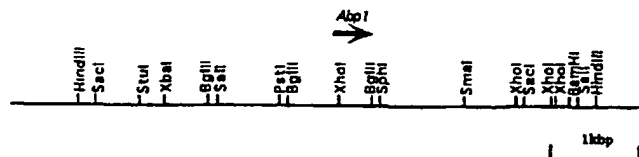
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REGULATORY SEQUENCES FUNCTIONING IN FILAMENTOUS FUNGI

(54) 発明の名称: 糸状菌において機能する制御配列および発現系



(57) Abstract: A promoter and a terminator functioning synchronously with the expression of an endogenous gene in filamentous fungi belonging to *Agonomycetales* (in particular, *Mycelia sterilia*). The above promoter contains the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:1 and its homolog. The above terminator contains the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 and its homolog. Further, an expression vector highly expressing a target protein in filamentous fungi; a transformed filamentous fungus capable of producing the target protein at a high yield; and a process for producing the target protein in the transformed filamentous fungus; are provided.

[続葉有]

WO 01/18219 A1



(57) 要約:

本発明によれば、無孢子不完全菌に属する糸状菌、特に Mycelia sterilia、において、内在する遺伝子の発現と同調して機能するプロモーターおよびターミネーターが提供される。本発明によるプロモーターは配列番号 1 のヌクレオチド配列およびその相同体を含んでなるものである。本発明によるターミネーターは配列番号 2 のヌクレオチド配列およびその相同体を含んでなるものである。本発明によれば、糸状菌において目的タンパク質を高発現する発現ベクター、目的タンパク質を高生産する形質転換された糸状菌、形質転換された糸状菌において目的タンパク質を製造する方法も提供される。

明 細 書

糸状菌において機能する制御配列および発現系

発 明 の 背 景

発明の分野

本発明は糸状菌において機能するプロモーターおよびターミネーター、それらを含んでなる発現ベクター、およびそれにより形質転換された宿主に関する。

関連技術の説明

糸状菌であるPF1022菌株 (Mycelia sterilia) は駆虫活性を有する24員環状デブシペプチドであるPF1022物質を生産する (FERM BP-2671)。本菌株は有性および無性の生殖器官を形成しないため、無孢子不完全菌に分類される (特開平3-35796号)。

一方、薬剤耐性ととともにアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 由来のタカアミラーゼ遺伝子を連結したプラスミドをPF1022菌株に導入することにより、PF1022菌株の形質転換体を得られている (W097/00944号)。

しかし、W097/00944号公報に示されているアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) 由来のタカアミラーゼ遺伝子の制御DNA配列は、異種菌株由来の制御DNA配列である。しかもMycelia steriliaは遺伝学的特性は未だ十分に明らかにされておらず、発現ベクター系が満たすべき条件も不明である。従って、異種菌株由来の制御配列を用いた形質転換体については、PF1022菌株に内在する遺伝子の発現と同調した発現制御がなされるかどうか不明である。また、PF1022菌株は無孢子不完全菌に属するため、アスペルギルス (Aspergillus) 属以外の、トリコデルマ (Trichoderma) 属、フザリウム (Fusarium) 属、およびノイロスポーラ (Neurospora) 属等において使用されている従来の制御DNA配列が合目的に発現するかどうか同様に不明である。

このことから、Mycelia steriliaで安定して機能する制御配列および発現ベクター系、さらにそれを利用したMycelia steriliaにおける有用物質の生産技術の確立が望まれているといえる。

発 明 の 概 要

本発明は、無孢子不完全菌に属する糸状菌、特にMycelia sterilia、において、内在する遺伝子の発現と同調して機能する制御配列を提供することをその目的とする。

本発明はまた、無孢子不完全菌に属する糸状菌、特にMycelia sterilia、において目的タンパク質を高発現する発現ベクターの提供をその目的とする。

本発明は更にまた、目的タンパク質を高生産する、形質転換された無孢子不完全菌に属する糸状菌、特にMycelia sterilia、の提供をその目的とする。

本発明はまた、無孢子不完全菌に属する糸状菌、特にMycelia sterilia、において目的タンパク質を製造する方法の提供をその目的とする。

本発明者らは、P F 1 0 2 2 菌株において、高率に発現している遺伝子 (Abp1 遺伝子) とその制御DNA配列を単離、同定することに成功した。

本発明者らはまた、得られた制御DNA配列を用いて遺伝子発現用の発現ベクターを作製し、これをP F 1 0 2 2 物質生産菌に導入し、形質転換体を得、このプロモーターの下流に連結した目的遺伝子をその機能が損なわれることなく効率的に発現させることに成功した。

本発明によるプロモーターは、下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるもの、およびプロモーター活性を有するその断片である：

- (a) 配列番号1のヌクレオチド配列、
- (b) 配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有し、かつプロモーター活性を有するヌクレオチド配列、
- (c) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつプロモーター活性を有する配列番号1のヌクレオチド配列の改変体、および
- (d) ストリンジェントな条件下で配列番号1のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するヌクレオチド配列。

本発明によるターミネーターは、下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるもの、およびターミネーター活性を有するその断片である：

- (e) 配列番号2のヌクレオチド配列、
- (f) 配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有し、かつ

ターミネーター活性を有するヌクレオチド配列、

(g) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される 1 以上の改変を有し、かつターミネーター活性を有する配列番号 2 のヌクレオチド配列の改変体、および

(h) ストリンジェントな条件下で配列番号 2 のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するヌクレオチド配列。

本発明による発現ベクターは前記プロモーターまたはその断片と前記ターミネーターまたはその断片とをいずれかまたは両方含んでなるものである。

本発明による形質転換された宿主は前記発現ベクターにより形質転換されたものである。

本発明による目的物質の製造法は、前記の形質転換された宿主を培養し、次いで培養物から目的タンパク質を採取することを含んでなるものである。

図面の簡単な説明

図 1 は Abp1 遺伝子を含む 6kb の HindIII 断片の制限酵素地図を示す。

図 2 は pABPd の構成および制限酵素地図を示す。

発明の具体的な説明

微生物の寄託

P F 1 0 2 2 菌株は、1989 年 1 月 24 日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-2671 である。

制御配列

本発明によれば P F 1 0 2 2 生産菌で機能する制御配列、すなわち、プロモーターおよびターミネーターが提供される。

配列 (b) において、配列番号 1 のヌクレオチド配列との同一性は、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% であることができる。

配列 (f) において、配列番号 2 のヌクレオチド配列との同一性は、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、最も好ましくは少なくとも 95% であることができる。

配列 (c) および配列 (g) において、改変の数は、例えば 1 ～ 数十個である

ことができる。

配列 (c) および配列 (g) において改変が複数個存在する場合、導入された改変の種類は同一でも異なってもよい。

配列 (d) および配列 (h) において、「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄操作を、高温下低塩濃度溶液中で行うことを意味し、例えば、 $0.5 \times \text{SSC}$ 濃度 ($1 \times \text{SSC} : 15 \text{ mM}$ クエン酸3ナトリウム、 150 mM 塩化ナトリウム)、 60°C 、15分間の洗浄条件、好ましくは $0.5 \times \text{SSC}$ 濃度、 0.1% SDS 溶液中で 60°C 、15分間の洗浄条件、を意味する。

プロモーター活性を有する断片は、少なくとも600塩基対、好ましくは少なくとも800塩基対、より好ましくは少なくとも1000塩基対、最も好ましくは少なくとも1200塩基対の長さであることができる。

ターミネーター活性を有する断片は、少なくとも400塩基対、好ましくは少なくとも600塩基対、より好ましくは少なくとも800塩基対、最も好ましくは1000塩基対の長さであることができる。

配列 (b)、(c)、および (d)、並びにプロモーター活性を有する断片に関して、「プロモーター活性を有する」か否かは、例えば、実施例3に記載のように発現ベクターを作成し、実施例4に記載のように異種遺伝子を宿主にて発現させ、異種タンパク質の生産を検出することにより評価することができる。

配列 (f)、(g)、および (h)、並びにターミネーター活性を有する断片に関して、「ターミネーター活性を有する」か否かは、例えば、実施例3に記載のように発現ベクターを作成し、実施例4に記載のように異種遺伝子を宿主にて発現させ、異種タンパク質の生産を検出することにより評価することができる。

本発明によるプロモーターおよびターミネーターは無孢子不完全菌に分類される糸状菌、特に *Mycelia* に属する微生物、より具体的には *Mycelia sterilia* に属する微生物、で機能することができる。

本発明によるプロモーターおよびターミネーターはPF1022生産菌において機能することができる。PF1022生産菌としてはPF1022物質を生産する無孢子不完全菌に分類される糸状菌が挙げられる。

本発明によるプロモーターおよびターミネーターは例えば以下のようにして得ることができる。

P F 1 0 2 2 株のmRNAをP F 1 0 2 2 物質生産時の細胞より単離し、それを鋳型に用いてcDNAを合成する。それを無作為に選抜し、塩基配列解析を行い、高い頻度で発現している遺伝子、即ちAbp1遺伝子に由来するcDNAを単離する。

P F 1 0 2 2 株からゲノムDNAを抽出し、適当な制限酵素にて切断後、ファージベクターまたはプラスミドベクターを用いて、P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノムDNAからなるライブラリーを作製する。

このように調製したP F 1 0 2 2 株由来のゲノムDNAライブラリーより、Abp1遺伝子をコードする翻訳領域をプローブとして用いて、Abp1遺伝子全長のクローニングを行う。単離されたゲノムDNAおよび前記cDNAの塩基配列を比較検討し、本遺伝子のプロモーターおよびターミネーター部位を決定し、プロモーターおよびターミネーターとすることができる。

発現ベクター

本発明によればP F 1 0 2 2 物質生産菌で機能する制御配列を含んでなる発現ベクターが提供される。

本発明による発現ベクターの構築の手順および方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

本発明において使用できる発現ベクターとしては、宿主染色体DNAに組込まれるものや、自己複製可能な自律的複製配列を有するベクターを宿主細胞内でプラスミド状態で存在させるものが挙げられ、例えば、pUC系 (pUC18又はpUC118等)、pBluescript系 (pBluescriptII KS+等)、およびpBR322等のプラスミドが挙げられる。宿主細胞内に存在する遺伝子のコピー数は、1コピーでも複数であっても良い。

本発明による発現ベクターは、その第一の態様において、本発明によるプロモーターおよび/またはターミネーターと、場合によっては遺伝子マーカーおよび/または他の制御配列とを含んでなるものである。従って、本発明によるプロモーターおよびターミネーターのいずれかあるいは両方を含んでなる発現ベクター

は本発明の範囲に包含される。

本発明によるプロモーターを少なくとも含んでなる発現ベクターにあっては、ターミネーターは本発明によるターミネーター以外のものであってもよい。

本発明によるターミネーターを少なくとも含んでなる発現ベクターにあっては、プロモーターは本発明によるプロモーター以外のものであってもよい。

遺伝子マーカーの導入は、例えば、本発明による制御配列にPCR法により適当な制限酵素切断部位を導入し、これをプラスミドベクターに挿入した後、薬剤耐性遺伝子および／または栄養要求性相補遺伝子等の選択マーカー遺伝子を連結する事により行うことができる。

遺伝子マーカーは形質転換体の選択手法に応じて適宜選択できるが、例えば、薬剤耐性をコードする遺伝子や栄養要求性を相補する遺伝子を使用することができる。薬剤耐性遺伝子としては、デストマイシン、ベノミル、オリゴマイシン、ハイグロマイシン、G418、ブレオマイシン、ピアラフォス、ブラストサイジンS、フレオマイシン、フォスフィノスリシン、アンピシリン、カナマイシン等の薬剤に対する遺伝子が挙げられる。栄養要求性を相補する遺伝子としては、amdS、pyrG、argB、trpC、niaD、TRP1、LEU2、URA3等の遺伝子が挙げられる。

本発明による発現ベクターは、その第二の態様において、更にその制御配列に作動可能に連結された目的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

制御配列への連結は、例えば、常法に従い、目的タンパク質をコードする遺伝子（目的遺伝子）の翻訳領域をプロモーターの下流に順方向に挿入することによって行うことができる。この場合、目的遺伝子を他のタンパク質の翻訳領域をコードする外来遺伝子と連結させて融合タンパク質として発現させることもできる。本明細書において「目的遺伝子」とは、発現の対象となる任意の遺伝子を意味し、異種遺伝子または同種遺伝子のどちらでも良い。目的遺伝子は、例えば、PF1022物質生産関連遺伝子群から選ばれる遺伝子であることができる。

形質転換体および目的タンパク質の生産

本発明によれば前記発現ベクターにより形質転換された宿主が提供される。

本発明において使用できる宿主としては、遺伝子組換えの宿主として使用可能

な微生物であれば特に限定されるものではないが、糸状菌、好ましくは無孢子不完全菌に分類される糸状菌、より好ましくはMycelia に属する微生物、最も好ましくはMycelia steriliaに属する微生物が挙げられる。本発明において使用できる宿主としてはまた、P F 1 0 2 2 物質生産菌、好ましくはP F 1 0 2 2 物質を生産する糸状菌、より好ましくはP F 1 0 2 2 物質を生産するP F 1 0 2 2 菌株 (FERM BP-2671) が挙げられる。

宿主への遺伝子発現用の組換えベクターの導入は、常法に従って行うことができる。導入法としては、例えば、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、アグロバクテリウム法、リチウム法または塩化カルシウム法等が挙げられ、宿主細胞にとって効率の良い手法が選択される。P F 1 0 2 2 物質生産菌を宿主として用いる場合、好ましくはポリエチレングリコール法である。

本発明によれば前記形質転換体を培養する工程を含む目的タンパク質の製造法が提供される。

形質転換体の培養は常法に従って、培地、培養条件等を適宜選択することにより行うことができる。培地としては、慣用の成分、例えば炭素源としては、グルコース、シュークロース、セルロース、水飴、デキストリン、澱粉、グリセロール、糖蜜、動・植物油等が使用できる。また、窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、ファーマメディア、コーン・スティープ・リカー、綿実粕、ブイヨン、ペプトン、ポリペプトン、マルトエキス、イーストエキス、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素等が使用できる。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸およびその他のイオンを生成することのできる無機塩類、例えば塩化カリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素 2 カリウム、硫酸マグネシウム、リン酸 1 カリウム、硫酸亜鉛、硫酸マンガン、硫酸銅を添加することも有効である。また、必要に応じてチアミン (チアミン塩酸塩等) 等の各種ビタミン、グルタミン酸 (グルタミン酸ナトリウム等)、アスパラギン (DL-アスパラギン等) 等のアミノ酸、ヌクレオチド等の微量栄養素、抗生物質等の選抜薬剤を添加することもできる。さらに、菌の発育を助け、環状デブシペプチドの生産を促進するような有機物および無機物を適当に添加することができる。

培養方法は、液体培地では、好氣的条件での培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法または深部培養法により行うことができる。培地のpHは、例えばpH 6～pH 8 程度である。培養温度は通常の条件、例えば温度 14℃～40℃、好ましくは 26℃～37℃、培養日数は、2日～25日間程度の条件で行うことができる。

また、本発明による目的タンパク質の製造法においては、形質転換された細胞の培養物から目的とする遺伝子発現産物であるタンパク質を取得することができる。培養物から目的タンパク質を抽出（磨砕処理、加圧破碎等）し、回収（ろ過、遠心分離等）し、および精製（塩析法、溶媒沈殿法等）する事ができる。またこれらの過程において、必要に応じてフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、ベンズアミジンまたはロイペプチン等のプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。

実 施 例

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1：cDNAのランダムシーケンスによる高発現遺伝子の検索

PF 1022物質生産菌内で高率に発現している遺伝子を検索するため、PF 1022物質生産菌由来のcDNAを無作為にクローニングし、そのDNA配列の比較を行い、大量に発現している遺伝子を分離同定した。

(1) PF 1022物質生産菌由来cDNAの調製

PF 1022菌株（FERM BP-2671）を生産培地（グルコース 2.0%、澱粉 5.0%、小麦胚芽 0.8%、大豆粕 1.3%、肉エキス 0.38%、塩化ナトリウム 0.13%、および炭酸カルシウム 0.15%；殺菌前pHが7.0；W097/00944号 実施例4参照）で26℃、4日間培養し、遠心分離（3000 rpm、10分）により菌体を回収した。これを精製水で洗浄し、-80℃で凍結後、液体窒素存在下、ブレンダー（日本精機社製AM-3）で粉碎した。これを変性液（4M グアニジンチオシアン酸、25mMクエン酸3ナトリウム、0.5%N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、0.1Mメルカプトエタノール）に懸濁後、室温で5分間攪拌の後、2M酢酸ナトリウム（pH4.5）で中和し、TE飽和フェノールを加え更に攪拌した。ここにクロロホルム-イソアミルアルコール（24:1）を加え、攪拌の後、遠心分離に

よりフェノールで変性した菌体成分を分離した。上層（水層）を回収し、イソプロパノールで核酸を沈殿化した。この沈殿は核酸濃度1mg/mlとなるようにTE（10 mMトリス-塩酸（pH8.0）、1mM EDTA）に溶解し、2.5M塩化リチウムで沈殿化（5°C、2時間）した。これを遠心分離により回収し、70%エタノールで洗浄後、TEに再溶解し、これを全RNA画分とした。

全RNA画分はmRNAピュアリフィケーションキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、mRNAを精製した。更に、このmRNAを鋳型にタイムセーバー-cDNA合成キット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いて、cDNAを合成した。

（2）cDNAのランダムシーケンス

実施例1（1）のように調製したcDNAを、EcoRI切断後、アルカリフォスファターゼ処理したpUC18にDNAライゲーションキットVer.2（宝酒造社製）を用いて連結した。これを大腸菌JM109株に導入し、形質転換した各種コロニーをアンピシリンを含むLB培地（1%ポリペプトン、0.5%イーストエキス、1%塩化ナトリウム）で培養した。これらの形質転換体からのプラスミドの精製はフレキシブレップキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いた。

上記のように調製した40種のプラスミドをALF DNAシーケンサーII（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に供し、挿入断片のDNA配列を解読した。シーケンスゲルはロングレンジャー（FMC社製）、シーケンス反応はオートリードシーケンシングキット（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を用いた。

その結果、10種のクローンが同一のDNA塩基配列を示した。そこでクローン化された遺伝子をAbp1と命名し、本遺伝子のプロモーターおよびターミネーターをゲノムDNAよりクローニングすることとした。

（3）P F 1 0 2 2 物質生産菌のゲノムDNAの単離

P F 1 0 2 2 菌株（FERM BP-2671）のゲノムDNAの単離は（H. Horiuchi et. al., J. Bacteriol., 170, 272-278, (1988)）に記載の方法に従った。具体的には、まずP F 1 0 2 2 物質生産菌（FERM BP-2671）を種培地（可溶性澱粉 2.0%、グルコース 1.0%、ポリペプトン 0.5%、小麦胚芽 0.6%、酵母エキス 0.3%、大豆粕 0.2%および炭酸カルシウム 0.2%；殺

菌前がpH 7.0; W097/00944号 実施例1参照)で2日間培養し、遠心分離(3500rpm、10分)によって菌体を回収した。次いで、得られた菌体を凍結乾燥後、TEに懸濁し、3%SDS溶液中、60°C、30分間処理後、TE飽和フェノール抽出により、菌体残渣を除去した。抽出液はエタノール沈殿化後、リボヌクレアーゼA(シグマ社製)およびプロテイナーゼK(和光純薬社製)処理し、さらに12%ポリエチレングリコール6000により核酸を沈殿化させた。これをTE飽和フェノール抽出、エタノール沈殿化を行い、同沈殿をTEに溶解し、これをゲノムDNAとした。

(4) PF1022物質生産菌のゲノムライブラリーの作製

実施例1(3)のように調製したPF1022物質生産菌由来ゲノムDNAをSau3AIにより部分消化した。これをファージベクター、 λ EMBL3クローニングキット(ストラタジーン社製)のBamHIアームにT4リガーゼ(宝酒造社製ライゲーションキットVer.2)を用いて連結させた。これをエタノール沈殿後、TEに溶解した。連結混合物の全量をギガバックIIIプラスパッケージングキット(ストラタジーン社製)を用いて、大腸菌LE392株に感染させ、ファージブランクを形成させた。この方法により得られた 1.3×10^4 個(2.6×10^4 PFU/ml)のファージライブラリーを用いてAbp1遺伝子のクローニングを行った。

(5) PF1022物質生産菌由来のゲノムDNAからのAbp1遺伝子クローニング

プローブはAbp1遺伝子の翻訳領域をPCR法により増幅し、用いた。実施例1(3)のように調製したゲノムDNAを鋳型に、8-73Uおよび8-73Rなる合成プライマーを用いて、レッツゴーPCRキット(サワディーテクノロジー社製)に従いPCRを行った。PCRの反応条件は、94°C30秒間、50°C30秒間、72°C90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下に8-73Uおよび8-73RのDNA配列を示す。

8-73U: CTCAAACCAGGAAGCTCTTTC (配列番号7)

8-73R: GACATGTGGAAACACATTTTG (配列番号8)

このようにして得られたPCR産物はECLダイレクトシステム(アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いて、標識化した。実施例1(4)のように作成したファージブランクは、ハイボンドN+ナイロントランスファーメンブラン(アマシャムファルマシアバイオテック社製)に転写し、アルカリ変性後、5倍濃度SSC(SSC: 15mM クエン酸3ナトリウム、150mM 塩化ナトリウム)で洗浄し、乾燥さ

せDNAを固定した。キットに記載の方法に従って、1時間のプレハイブリダイゼーション（42℃）の後、先の標識化したプローブを添加し、16時間（42℃）ハイブリダイゼーションを行った。プローブの洗浄は前述キットに記載の方法に従った。プローブの洗浄を行ったナイロン膜は、検出溶液に1分間浸したあと、メディカルX線フィルム（富士写真フィルム社製）に感光させ、1個の陽性クローンを得た。本クローンはサザン解析の結果、少なくとも6kbのHindIII断片がゲノムDNAの制限酵素断片長と一致していた。このHindIII断片の制限酵素地図を図1に示す。HindIII断片はpUC119にサブクローニングし（pRQHin/119）、以降の実験に供した。

実施例2：Abp1遺伝子のプロモーターおよびターミネーターのDNA配列決定

DNA配列解析用テンプレートとしてpRQHin/119をSalIおよびSmaIで消化し、同様の制限酵素で消化しておいたpUC18に連結し、これをDNA配列解析用テンプレートとした。DNA配列解析は実施例1（2）と同様に行った。次に、実施例1（2）で得られたcDNAの塩基配列と比較し、Abp1遺伝子のプロモーターおよびターミネーター領域を決定し、そのDNA配列をそれぞれ配列表の配列番号1および配列番号2に示す。

実施例3：Abp1遺伝子の発現制御領域を用いた発現ベクターの構築

pRQHin/119を鋳型にAbp1遺伝子のプロモーター領域およびターミネーター領域をPCR法を用いて増幅した。プロモーターの増幅はABP-NecoおよびABP-Nbam、一方、ターミネーターの増幅はABP-CbamおよびABP-Cxbaなるプライマーを用い、PCRスーパーミックスハイフィデリティ（ライフテックオリエンタル社製）によりPCR法を行った。反応条件は、94℃30秒間、50℃30秒間、72℃90秒間のステップを25回繰り返すことにより増幅を行った。以下にABP-Neco、ABP-Nbam、ABP-CbamおよびABP-CxbaのDNA配列を示す。

ABP-Neco: GGGGAATTCGTGGGTGGTGATATCATGGC（配列番号3）

ABP-Nbam: GGGGGATCCTTGATGGGTTTTGGG（配列番号4）

ABP-Cbam: GGGGGATCCTAACTCCCATCTATAGC（配列番号5）

ABP-Cxba: GGGTCTAGACGACTCATTGCAGTGAGTGG（配列番号6）

各PCR産物はマイクロスピンS-400カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社製）で精製し、エタノール沈殿化の後、プロモーターはEcoRIおよびBamHI、タ

ーミネーターはBamHIおよびXbaIで消化し、同様の酵素で消化したpBluescriptII KS+に順次連結した。これをXbaIで消化し、pMKD01 (W098/03667号) 由来デストマイシン耐性カセットを挿入しpABPdを構築した (図2)。

実施例4： β -グルクロニダーゼ遺伝子を用いた発現ベクターの能力確認

レポーター遺伝子として用いた β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子の翻訳領域はpLC-GUS (K. Yanai, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, (1996)) をBamHIで切断することにより得た。これをあらかじめBamHI消化、アルカリフォスファターゼ処理しておいたpABPdに連結し、Abp1プロモーターの下流にGUS遺伝子が挿入されたプラスミド、pABPd-Gを構築した。

pABPd-GによるP F 1 0 2 2物質生産菌 (FERM BP-2671) の形質転換はW097/00944号の実施例1に記載されている方法に従って行った。その結果、1 μ gのDNAあたり約3個の形質転換体を得られた。

このようにして得られた形質転換体は実施例1 (1) の生産培地を用いて液体培養し、遠心分離により菌体を回収した。得られた菌体はミニビードピーター (バイオスベックプロダクツ社製) を用いて細胞を破碎した。これを遠心分離し、菌体残渣を除去し、上澄のGUS活性を測定した。活性測定は (K. Yanai, et. al., Biosci. Biotech. Biochem., 60, 472-475, (1996)) に記載の方法に従った。

その結果、表1から明らかのように、pABPd-G形質転換体のみに顕著なGUS活性が認められた。すなわち、該発現ベクターであるpABPdは、P F 1 0 2 2物質生産菌で有効に機能することが確認された。

表1：形質転換体のGUS活性

| | 発現ベクター | GUS活性 (A405/ μ gタンパク質) |
|-------|---------|----------------------------|
| 形質転換体 | pABPd-G | 7 5 6 . 9 |
| 形質転換体 | pABPd-G | 8 3 2 . 5 |
| 形質転換体 | pABPd | 0 . 0 |
| 宿主 | — | 0 . 0 |

請 求 の 範 囲

1. 下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるプロモーター、およびプロモーター活性を有するその断片：

- (a) 配列番号1のヌクレオチド配列、
- (b) 配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有し、かつプロモーター活性を有するヌクレオチド配列、
- (c) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつプロモーター活性を有する配列番号1のヌクレオチド配列の改変体、および
- (d) ストリンジェントな条件下で配列番号1のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するヌクレオチド配列。

2. (b) が配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項1に記載のプロモーター。

3. (b) が配列番号1のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項1に記載のプロモーター。

4. 無孢子不完全菌に分類される糸状菌において機能する、請求項1に記載のプロモーター。

5. プロモーター活性を有する断片が、少なくとも600塩基対の長さである、請求項1に記載のプロモーター。

6. 下記からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなるターミネーター、およびターミネーター活性を有するその断片：

- (e) 配列番号2のヌクレオチド配列、
- (f) 配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有し、かつターミネーター活性を有するヌクレオチド配列、
- (g) 置換、欠失、付加、および挿入から選択される1以上の改変を有し、かつターミネーター活性を有する配列番号2のヌクレオチド配列の改変体、および
- (h) ストリンジェントな条件下で配列番号2のヌクレオチド配列とハイブリダイズし、かつターミネーター活性を有するヌクレオチド配列。

7. (f) が配列番号2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を

有するヌクレオチド配列である、請求項 6 に記載のターミネーター。

8. (f) が配列番号 2 のヌクレオチド配列と少なくとも 90% の同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 6 に記載のターミネーター。

9. 無孢子不完全菌に分類される糸状菌において機能する、請求項 6 に記載のターミネーター。

10. ターミネーター活性を有する断片が、少なくとも 400 塩基対の長さである、請求項 6 に記載のターミネーター。

11. 請求項 1～5 のいずれか一項に記載のプロモーターまたはその断片を含んでなる、発現ベクター。

12. 請求項 6～10 のいずれか一項に記載のターミネーターまたはその断片を含んでなる、発現ベクター。

13. 請求項 1～5 のいずれか一項に記載のプロモーターまたはその断片と請求項 6～10 のいずれか一項に記載のターミネーターまたはその断片とを含んでなる、発現ベクター。

14. 発現ベクター pABPd である、請求項 13 に記載の発現ベクター。

15. 目的タンパク質をコードするヌクレオチド配列を更に含んでなり、かつヌクレオチド配列がプロモーターおよび／またはターミネーターと作動可能に連結された、請求項 11～14 のいずれか一項に記載の発現ベクター。

16. 請求項 11～15 のいずれか一項に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

17. 宿主が Mycelia sterilia である、請求項 16 に記載の宿主。

18. 請求項 16 または 17 に記載の宿主を培養し、次いで培養物から目的タンパク質を採取することを含んでなる、目的タンパク質の製造法。

///

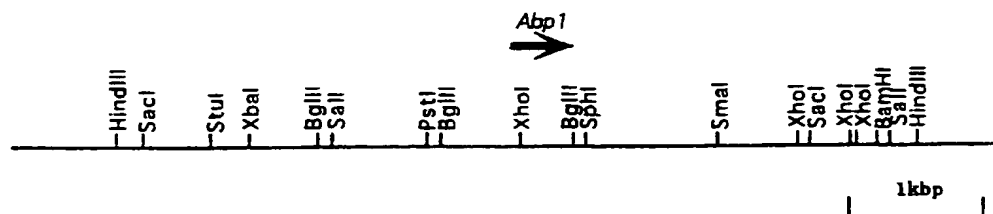


FIG. 1

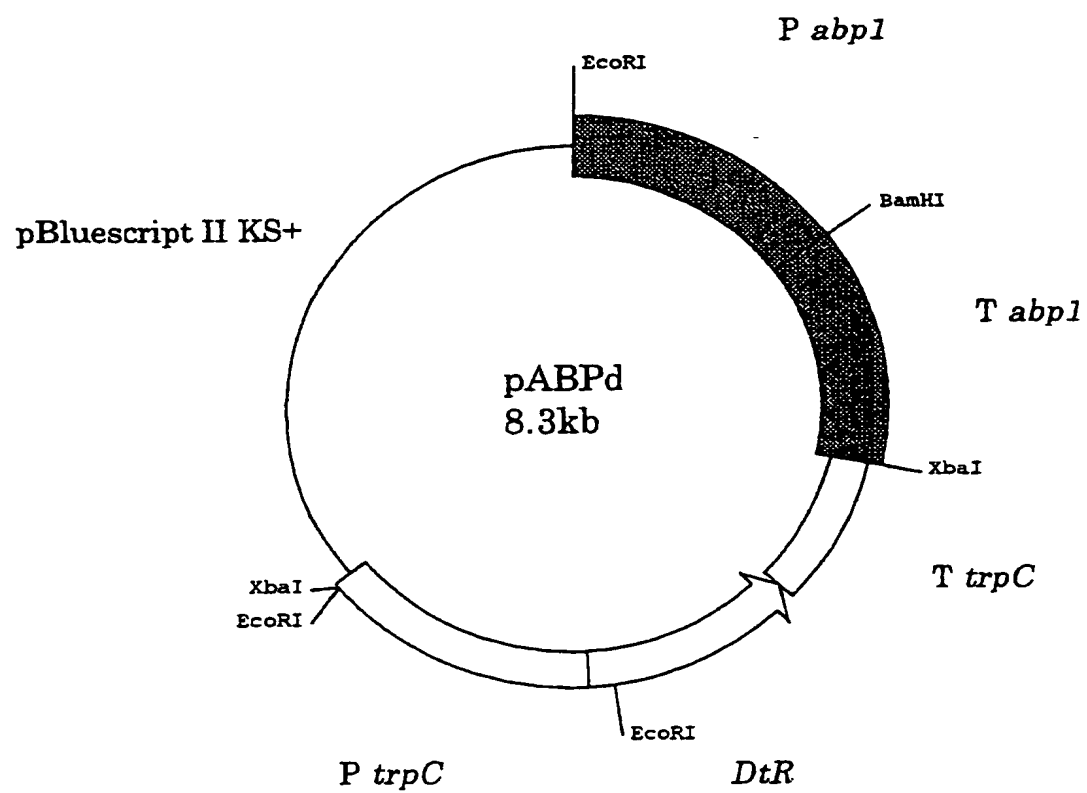


FIG. 2

1/7

SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Seika kaisha, Ltd.

<120> Regulatory sequences and expression system functional in mold fungi

<130> 127109

<150> JP 252851/1999

<151> 1999-09-07

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1378

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<400> 1

gtcgacgtgg gtggtgatat catggctgtg gtgtccaaaa ctgtgttagt gactacgaat 60

gaggaaagaa acggtggtgt tgtggcagct gaagactgaa gaaggagcca aagataattc 120

2/7

acaatgcgat acggttgcac caatgcttgt tcaagagagc acgttgcac tacctgggtgt 180
tccccctcttc gttgtacaag atcaagtatc ggatgacacc caccgccgaa cggaatcctg 240
gagttcaaag aggggtgtcgt ctacggcatt taggtataga tggcataggg tttgacgtaa 300
gctgaaagct gattacgaga catgagacaa cgaaaatata acggttgtat gcgttcccgt 360
gcttactaaa gtgatatcca agagcaacac agccgaaaga aaccgatgct gtctgagggg 420
ttcctttaga gtctacatgg taacgggtgca tgatagaaac atcaaattgc caatcaagtt 480
agtatacctg acgtacatc gctttcttcc ggatcttgcc taaaatatat gtgcctgtcc 540
gaactgtcgg tactgcttcg tactaactgt tcttcggtg aagtcctagg acaagcgccg 600
cgtttgtaga cctacatgat gccacatctt aaagcaggga tctgagacat tttctaaggc 660
atccatatag gcattgggag ctaagtcggc attgaaggag ataagggggg tgtgaaagtg 720
gtgtgtcaaa aggaggtcga ttggctatac cagccgctaa gcaggtgggc tagcagctgt 780
ctgcagctgt gaataacgtc acttgcttag gtatgtccac ctaatgtcag cagatgcaaa 840
tgctgattgg gttaaaatgg gcatgtagtg taggtgccga aaacacgttt agatctagtt 900
aaagggaagc tgaaagctga acctgtcaga aataagcctg ttggaatata acgttgataa 960
cccaattcag tcgtcaaggg tgtcctgata tgctggagct tcctgtcgc attgtggggg 1020

aactatttca tagtggggca gaatgcaact ctattttcaa ttgaatctaa actattcttg 1080

gtaggagttc tcaatgggtct tctcgctgtc acttacacac atcatggggg tcaacaacgt 1140

atacagcttc atagagagtg eggcattgaa gtagctaccg catcgaaccg ggaagcggtt 1200

caagacatgg gcgtacgtag atacatagag tcatagaaac ataaaaggag cttgaagaac 1260

cattcaaate ctaaggggtct ctcttctttc tgcatacat caagaatcat aactcaaac 1320

caggaactct ttctatcttc cctatagcaa ttcccaaaac ccatcaatca acctaaca 1378

<210> 2

<211> 1089

<212> DNA

<213> Mycelia sterilia

<400> 2

taaactccca tctatagcgg ttggctgaaa aggagagcgc gcaggagaga tcagtctttt 60

gaccagcttg gagatctgat ctgtgtttca gtctcagtaa cttgtgtgga agttacactt 120

ctggtctccc tccttaccag ccctccagc caaccacaag atgttaggag ttctgctcat 180

ttatatggct ctggcgatga gtagcattta tgaggcatgc acgacatggc tctactgctg 240

ctctgttggt taggttacct tagctagaca atatcacaat acaaaatgtg gtttccacat 300
gtcagctggt tctaccgtag tctgagtga atgggtaatt gatatatga gcttgacccc 360
gcaatattgt aacagagcca acaatgggtc acctggcccc ccagacatgt ggctatataa 420
gttacctgtc tagcaatcag acttactgat agaacgtccc cctatatgtc ataaaataag 480
tcactactag aactaccgac agtgtgaaat ccgacagtgt ctggtctgtt gaacatgtca 540
tgtctatatg aatgaataag aagaaggtgt gacgggttag tacgaatctg tatgataatc 600
aatggtagca gtgatggtaa acagcggatc gggatctagc actgctatgt ctgggtatgt 660
aatcctggct atgttcataa gggcgacata gaaagaatac ctcagtgtca gcatacgtaa 720
gctctgtaca ttctactgca aatttctgaa caattggaga gcattatgaa atactaaatg 780
gaactcctca ttataagtgg aaaacagagc gcccttttat tatgaaacag aagcgtcaag 840
aacgtctttc aacgtcatca gaggcgttcc atccagatca tactttccct tgaacctatg 900
tctcgcattc agaatcgtag cgatggaaac cgtccagggt tgcctgtcat tcccttgctg 960
cccttgcaat aaaatcgat taccattttc ttctgcagcg ccggtcaacg tgagcgacgt 1020
gccacggtg gagtccacaa tgaccagtgg atcgatcatc acgccactca ctgcaatgag 1080

5/7

tcgcccggg

1089

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 3

ggggaattcg tgggtggtga tatcatggc

29

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 4

gggggatacct tgatgggttt tggg

24

<210> 5

<211> 27

6/7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 5

gggggacacct aaactcccat ctatagc

27

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 6

gggtctagac gactcattgc agtgagtgg

29

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

7/7

<400> 7

ctcaaaccag gaactctttc

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer for Abp1 gene

<400> 8

gacatgtgga aaccacattt tg

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP00/06104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00
 //(C12N15, 80, C12R1:645)(C12N1/15, C12R1:645),
 (C12P21/00, C12R1:645)

According to International Patent Classification (IPC) r to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim N . |
|-----------|---|-----------------------|
| PA | JP, 11-276170, A (Amano Pharmaceut. Co., Ltd.), 12 October, 1999 (12.10.99) (Family: none) | 1-18 |
| A | EP, 382173, A2 (Meiji Seika Kaisha, Ltd.), 16 August, 1990 (16.08.90) & JP, 3-35796, A | 1-18 |
| A | JP, 7-123987, A (Amano Pharmaceut. Co., Ltd.), 16 May, 1995 (16.05.95) (Family: none) | 1-18 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 01 November, 2000 (01.11.00)

Date of mailing of the international search report
 14 November, 2000 (14.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00
 // (C12N15, 80, C12R1:645) (C12N1/15, C12R1:645),
 (C12P21/00, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
 BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| PA | JP, 11-276170, A (天野製薬株式会社) 12. 10 月. 1999 (12. 10. 99) ファミリーなし | 1-18 |
| A | EP, 382173, A2 (明治製菓株式会社) 16. 8月. 19 90 (16. 08. 90) & JP, 3-35796, A | 1-18. |
| A | JP, 7-123987, A (天野製薬株式会社) 16. 5月. 1 995 (16. 05. 95) ファミリーなし | 1-18 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 11. 00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

| | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 127109-648 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 6 1 0 4 | 国際出願日 (日.月.年) 0 7 . 0 9 . 0 0 | 優先日 (日.月.年) 0 7 . 0 9 . 9 9 |
| 出願人 (氏名又は名称) 明治製菓株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00// (C12N15, 80, C12R1:645) (C12N1/15, C12R1:645),
(C12P21/00, C12R1:645)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/80, C12N1/15, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| PA | JP, 11-276170, A (天野製薬株式会社) 12. 10 月. 1999 (12. 10. 99) ファミリーなし | 1-18 |
| A | EP, 382173, A2 (明治製菓株式会社) 16. 8月. 19 90 (16. 08. 90) & JP, 3-35796, A | 1-18. |
| A | JP, 7-123987, A (天野製薬株式会社) 16. 5月. 1 995 (16. 05. 95) ファミリーなし | 1-18 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 11. 00

国際調査報告の発送日

14.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



4N

9637

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 23 May 2001 (23.05.01) | |
| International application No. PCT/JP00/06104 | Applicant's or agent's file reference 127109-648 |
| International filing date (day/month/year) 07 September 2000 (07.09.00) | Priority date (day/month/year) 07 September 1999 (07.09.99) |
| Applicant WATANABE, Manabu et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
09 April 2001 (09.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Maria Kirchner Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|---|